



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Petra Kozulić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

**SUVREMENE METODE AFINITETNE
KROMATOGRAFIJE U BIOKEMIJI**

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2018. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

15. kolovoza 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PROČIŠĆAVANJE REKOMBINANTNIH PROTEINA	3
2.1. Sudbina proteina nakon razbijanja stanice.....	3
2.2. Topljivi proteini	3
2.3. Netopljivi proteini	4
§ 3. ULOGA AFINITETNE KROMATOGRAFIJE U PROČIŠĆAVANJU PROTEINA.....	5
§ 4. AFINITETNI PRIVJESCI.....	6
4.1. Histidinski privjesak (His-tag)	6
4.2. Strep - tag	7
4.3. Vezni protein za maltozu (MBP).....	8
4.4. Glutation-S-transferaza (GST)	8
4.5. Protein SUMO.....	9
4.6. Uzastopna afinitetna kromatografija (TAP)	9
§ 5. UKLANJANJE AFINITETNIH PRIVJESAKA	12
5.1. Endoproteaze.....	12
5.1.1. Enteropeptidaze	12
5.1.2. Trombin.....	13
5.1.3. Faktor Xa	13
5.1.4. Proteaza TEV-a.....	13
5.1.5. Proteaza 3C iz humanog rinovirusa.....	14
5.2. Egzoproteaze	14
5.2.1. Metalokarboksiptidaze	15
5.2.2. Aminopeptidaze.....	15
§ 6. ZAKLJUČNE NAPOMENE	16
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	17

§ Sažetak

Afinitetna kromatografija istaknula se kao moderna i korisna, a pritom veoma učinkovita skupina kromatografskih tehnika. Mnoge druge kromatografske metode i dalje su sastavni dio biokemijskih istraživanja jer su svaka na svoj način nezamjenjive. Međutim, razvoj znanosti s vremenom iziskuje mnogo zahtjevnije metode, a kako bi se mogao zabilježiti daljnji napredak, skupine tehnika poput afinitetne kromatografije nameću se kao pravi odabir.

Upotreba afinitetne kromatografije danas je raširena u većini farmaceutskih industrija te je također veoma značajna kod proteomskih istraživanja. Pročišćavanje rekombinantnih proteina dobivenih ekspresijom u različitim stanicama domaćina skoro je nezamislivo bez barem jednog koraka afinitetnog odjeljivanja ili detekcije ciljanih proteina pomoću njihovog specifičnog afiniteta prema nekoj drugoj molekuli. U cjelokupnu priču o pročišćavanju rekombinantnih proteina uključeni su različiti afinitetni privjesci od kojih neki nisu još u potpunosti istraženi, te pripadajuće proteaze - enzimi koji specifično cijepaju afinitetne privjeske u svrhu oslobađanja pročišćenog proteina.

Cilj ovog rada je opisati tehnike afinitetne kromatografije, upoznati se s njezinom upotrebom u procesu pročišćavanja rekombinantnih proteina i saznati više o izazovima i mogućnostima ove skupine tehnika zahvaljujući kojima je afinitetna kromatografija dospjela u sam vrh istraživačke suvremene biokemije.

§ 1. UVOD

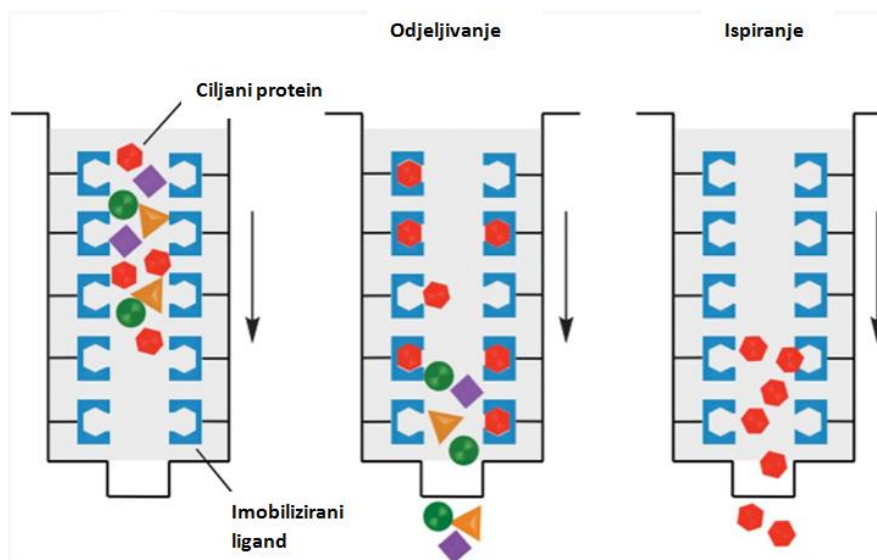
Proteini su veoma složene i svestrane molekule koje u živim organizmima obavljaju važne biološke funkcije. Za otkrivanje funkcije koju obavlja neki pojedini protein potrebno je provesti mnoga istraživanja nad istim. Funkciju proteina moguće je ustanoviti određivanjem aminokiselinskog slijeda polipeptidnog lanca što zahtjeva postojanje čistog proteina. Stoga ne čudi poznata uzrečica: „Nikad ne troši čiste misli na nečiste proteine.“ Kako dobiti čisti protein iz složene smjese koja sadržava uz protein od interesa i brojne druge proteine te ostale komponente stanice?

Prvi korak istraživanja svakog biokemičara je proces pročišćavanja. Proteini se mogu pročititi iz sirovih ekstrakata pomoću različitih metoda. Većina metoda međutim najčešće koristi jednu (ili više) vrsta kromatografije. Kromatografske tehnike temelje se na različitim svojstvima kao što su veličina, naboj, topljivost ili specifični afinitet vezanja.¹⁵ Jedna od mnoštva tehnika, korisna i opće prihvatljiva, je afinitetna kromatografija. Standardna afinitetna kromatografija temelji se na izraženom afinitetu proteina od interesa prema specifičnim kemijskim spojevima. Na taj način omogućeno je vezanje proteina na kromatografski stupac na kojem se nalazi specifičan spoj i propuštanje drugih nevezanih proteina pomoću eluensa (slika 1).

U današnje vrijeme puno više se koristi druga tehnika afinitetne kromatografije koja također uključuje interakciju protein-ligand, međutim u ovom se slučaju gen koji kodira ekspresiju proteina dodatno modificira tako da svaki protein sadrži i poseban privjesak, tzv. afinitetni privjesak. Određeni ligandi su kemijski imobilizirani, odnosno kovalentno vezani na čvrstu podlogu stupca te se stoga proteini s privjeskom koji imaju afinitet prema tim ligandima prilikom propuštanja kroz stupac čvrsto vežu na njih. Ligandi se najčešće direktno vežu na čvrstu podlogu ostvarujući kovalentnu vezu pomoću određenih funkcionalnih skupina (npr. karboksilna skupina, aldehidna skupina), no valja napomenuti da su mogući i drugi načini vezanja. U većini slučajeva, podloge za afinitetnu kromatografiju su komercijalno dostupne i već sadrže određene ligande vezane na tu podlogu. Nakon vezanja ciljanih proteina stupac se ispiru puferom kako bi se uklonile nevezane komponente uzorka. Na kraju, pufer za eluiranje ciljanog proteina kida interakcije protein-ligand i oslobađa pročišćeni protein. Prilikom odabira pufera za eluiranje treba obratiti pažnju na to da efektivno razdvaja protein-

ligand kompleksa a da pritom trajno ne narušava strukturu samog proteina. Najčešće puferi za eluiranje djeluju tako da koriste ekstremne vrijednosti pH ili ionske jakosti, ili to budu neki deterdženti koji općenito djeluju denaturirajuće na mnoge proteine. Ligandi su, kao što je prethodno spomenuto, vezani na čvrstu podlogu za punilo. Ta čvrsta podloga najčešće je netopljiva u uvjetima koji su pogodni za pročišćavanje ciljanog proteina. Poznato je i koristi se puno različitih podloga, uključujući agarozu, celulozu, dekstran i poliakrilamid. Svaka podloga treba imati neke osnovne karakteristike od kojih su najvažnije da je kemijski i mehanički stabilna, da sadrži reakcijske skupine koje lako tvore kovalentne veze s ligandima te da ima veliki omjer površine i volumena. Pojedine vrste afinitetnog odjeljivanja proteina zahtijevaju vlastiti set uvjeta i nadilaze jedinstvene izazove u provođenju istog.

Razvojem znanosti i tehnologija pomoću kojih se istražuju razni proteini pojavila se i potreba za proizvodnjom velike količine proteina te za stvaranjem različitih kombinacija gena. Tehnologija rekombinantne DNA omogućuje dobivanje rekombinantnih proteina. Rekombinantni proteini su modificirani proteini dobiveni u laboratorijskim uvjetima korištenjem izmijenjenih gena – tj. rekombinantne DNA. Ekspresija rekombinantnih proteina vrši se najčešće u stanicama *Escherichie coli* što omogućuje visoku razinu ekspresije. Nakon ekspresije proteina potrebno je dobivene proteine pročititi, često uz uporabu afinitetne kromatografije.



Slika 1. Prikaz procesa afinitetne kromatografije u tri koraka.²

§ 2. PROČIŠĆAVANJE REKOMBINANTNIH PROTEINA

Zašto je pročišćavanje rekombinantnih proteina toliko važna stavka u svakom biokemijskom istraživanju? Protein je prije istraživanja potrebno izdvojiti iz smjese s ostalim proteinima, da bi mogli istražiti njegova svojstva. Tek kada smo sigurni da imamo potpuni čisti protein možemo mu odrediti svojstva, strukturu i ulogu. Međutim, samom pročišćavanju proteina prethodi nekolicina drugih bitnih koraka, između ostalog, izolacija proteina iz stanice domaćina.

2.1. Sudbina proteina nakon razbijanja stanice

Prvi korak kod izolacije svih proteina iz stanica domaćina je mehanički ili kemijski (pomoću enzima) postupak razbijanja stanice koji omogućuje kidanje vanjske i unutarnjih membrana. Tim postupkom dobiva se sirovi stanični ekstrakt. Sljedeći korak – centrifugiranje, može se ponavljati više puta tijekom izolacije što se naziva diferencijalno centrifugiranje. Netopljivi proteini koji tvore inkluzijska tijela (netopljivi agregati) tijekom centrifugiranja taložiti će zajedno sa komponentama stanične stijenke. Topljivi proteini će zajedno sa staničnim polimerima biti lokalizirani u supernatantu. Daljnjim centrifugiranjem pri visokim brzinama moguće je iz supernatanta razdvojiti citosolne i periplazmatske proteine koji se zatim podvrgavaju procesu pročišćavanja. Za netopljive proteine postupak je malo kompliciraniji jer se prethodno trebaju podvrgnuti jakim denaturirajućim otapalima koja razaraju protein-protein interakcije. Takvi denaturirani proteini se direktno smataju u nativni oblik ili se najprije pročište, a zatim smotaju.

2.2. Topljivi proteini

Proces pročišćavanja topljivih proteina uključuje više vrsta kromatografskih metoda. Ukoliko se radi o topljivim rekombinantnim proteinima obilježenima afinitetnim privjescima najčešće korištena skupina tehnika je afinitetna kromatografija koja osigurava visoki stupanj pročišćavanja, a prednost je to što se može upotrijebiti u bilo kojem trenutku razdvajanja smjese proteina. Preostale faze procesa pročišćavanja mogu biti neke od ostalih poznatih kromatografskih metoda kao što je npr. ionsko – izmjenjivačka kromatografija. Ona se smatra

vrlo korisnim korakom jer omogućuje micanje proteina domaćina te ostalih neproteinskih dijelova stanice na temelju njihovih naboja. Najčešće se ponavlja u više navrata i s različito nabijenim matricama (pozitivno ili negativno) zbog raznolikosti naboja bočnih ogranaka proteina. Ponavljanju pojedinih ionskih izmjena prethodi promjena ionske jakosti i pH pomoću različitih pufera. Pročišćavanje može uključivati i gel filtraciju odnosno razdvajanje rekombinantnih proteina na temelju različitih molekulskih masa.

2.3. Netopljivi proteini

Tijekom ekspresije rekombinantnih proteina uobičajeno je pronaći i one koji nisu topljivi, već se zbog svojstva netopljivosti agregiraju u tzv. inkluzijska tijela. Pročišćavanje netopljivih proteina zahtjeva upotrebu denaturirajućih sredstava poput uree ili gvanidin hidroklorida za otapanje inkluzijskih tijela. Dovoljno visoke koncentracije tih sredstava omogućuju nastajanje potpuno razdvojenih monomera. Sljedeći, možda i najvažniji korak, je prelazak iz potpuno denaturirane forme proteina preko djelomično smotanog međuprodukta do native strukture. Proces ponovnog smatanja provodi se smanjivanjem koncentracije denaturirajućeg sredstva. Denaturirane proteine potrebno je najprije pročititi, a zatim podvrgnuti postupku renaturacije (ponovnog smatanja). Gel filtracija pokazala se kao korisna metoda jer uklanja proteine kod kojih solubilizacija nije bila potpuno uspješna ili proteine kod kojih je došlo do stvaranja disulfidnih mostova. Ovisno o uvjetima denaturacije (npr. vrsta denaturirajućeg sredstva) upotrebljavaju se i druge metode kromatografije poput ionsko-izmjenjivačke ili afinitetne. Nakon što se postignu svi uvjeti za ponovno smatanje proteina i kad u konačnici oni poprime svoju nativnu formu za njihovo razdvajanje koriste se sve već spomenute kromatografske metode. Međutim, broj koraka je puno manji nego kod pročišćavanja topljivih proteina zahvaljujući prethodno provedenima procesima pročišćavanja prilikom obrade inkluzijskih tijela.³

§ 3. ULOGA AFINITETNE KROMATOGRFIJE U PROČIŠĆAVANJU PROTEINA

Afinitetna kromatografija je prvenstveno razvijena kako bi olakšala detekciju i pročišćavanje rekombinantnih proteina. Uobičajena tehnika temelji se na visoko specifičnoj interakciji između dviju molekula čije prepoznavanje omogućuju različiti afinitetni privjesci. Prve biomolekule pročišćene ovom tehnikom bila su antitijela. Nakon nekoliko godina upotreba se proširila i na pročišćavanje enzima, rekombinantnih proteina te drugih biomolekula.

Zadnjih godina otkriveno je da afinitetni privjesci osim što igraju važnu ulogu kod prepoznavanja također imaju veoma pozitivan učinak na rekombinantni protein u smislu povećanja prinosa, topljivosti i potpomaganja smatanja. Povećanje prinosa rekombinantnih proteina najčešće je zasluga afinitetnih privjesaka na N-kraju proteina. Oni osiguravaju efikasnu inicijaciju translacije od N-kraja odnosno od metioninskog ostatka na N-kraju. Budući da se velika većina rekombinantnih proteina eksprimira u svom netopljivom obliku odnosno stvaraju se inkluzijska tijela, spoznaja da afinitetni privjesci povećavaju topljivost rekombinantnih proteina uvelike je olakšala istraživanje tih vrsta proteina. Razni faktori su do tada bili proučavani u svrhu povećanja topljivosti počevši od temperature, koekspresije molekularnih šaperona, modulatora smatanja, međutim kao najbolji alat pokazali su se afinitetni privjesci. Afinitetni privjesci koji povećavaju topljivost češće su proteini nego peptidi. Još uvijek nije potpuno razjašnjeno na koji način djeluju i zašto su neki od proteina efikasniji u ulozi privjesaka nego drugi. Jedan od važnijih nedostataka je to da će neki proteini svejedno tvoriti inkluzijska tijela nakon što se odvoje od afinitetnih privjesaka. Najpoznatiji protein koji vezujući se za ciljani protein povećava njegovu topljivost je vezni protein za maltozu (eng. *maltose binding protein*; MBP).

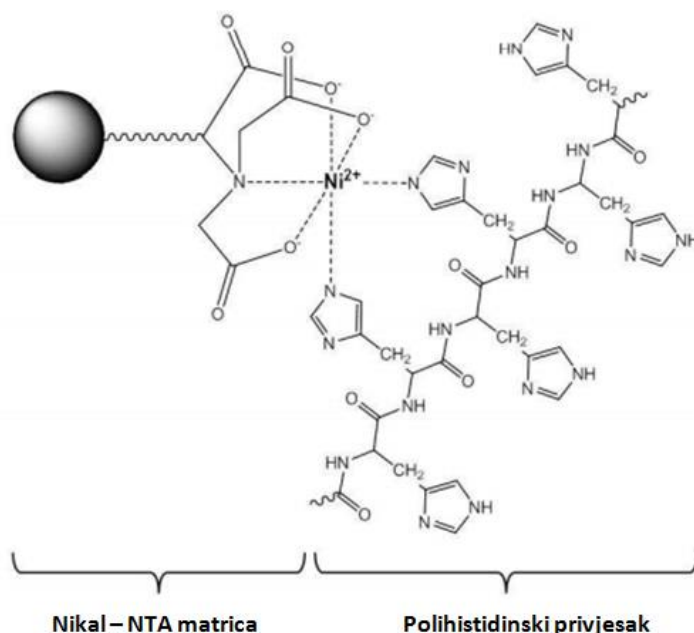
§ 4. AFINITETNI PRIVJESCI

Upotreba afinitetnih privjesaka dobivenih genetičkim inženjerstvom posljednjih godina doživjela je značajnu ekspanziju i danas postoji veliki repertoar različitih privjesaka koji se mogu upotrijebiti u svrhu poboljšanja bilo ekspresije, pročišćavanja, smatanja ili topljivosti rekombinantnih proteina (tablica 1). Prednost ovih metoda nad standardnim pročišćavanjem koje se temelji na nativnim svojstvima proteina jest visoka učinkovitost: rekombinantni proteini s određenim privjeskom često se pročiste iz smjese u samo jednom jednostavnom koraku selektivnog vezanja koristeći matricu s pravim ligandom. Naravno, tome prethodi poznavanje karakteristika i samog privjeska i liganda između kojih se ostvaruje interakcija. Privjesci se mogu podijeliti u više skupina na temelju različitih svojstava. Postoje podjele na temelju vrste liganda, biološkom podrijetlu privjeska ili njegovoj ulozi. Afinitetni privjesci postoje u obliku kratkih peptida ili cijelih proteina koji se postupcima genetičkog inženjerstva spajaju na N- ili C-kraj ciljanog proteina. Stoga, jedna od podjela afinitetnih privjesaka je na proteine koji prepoznaju male ligande i peptide koji se vežu na imobilizirane proteine. Druga podjela ugrubo razdvaja privjeske na one koji povećavaju topljivost i na afinitetne privjeske, iako mnogi od njih često istovremeno spadaju u obje skupine.

4.1. Histidinski privjesak (His-tag)

Pod nazivom His-tag krije se polihistidinski afinitetni privjesak koji se najčešće sastoji od šest histidinskih ostataka ali može imati i više. Metoda kojom se ovaj privjesak specifično veže na ligand poznata je kao afinitetna kromatografija na imobiliziranim ionima metala (eng. *immobilized metal affinity chromatography*; IMAC). IMAC je selektivna metoda koja se bazira na interakciji određenog aminokiselinskog ostatka na površini peptida i nekog metalnog iona (Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , ili Ni^{2+}) imobiliziranog na matrici pomoću polidentatne kelirajuće skupine poput nitrilotrioctene kiseline (eng. *nitrilotriacetic acid*; NTA). Histidin ostvaruje koordinativnu vezu sa bilo kojim od spomenutih metalnih iona međutim najčešće se koristi Ni^{2+} . Ni-NTA pokazuje veliki afinitet prema histidinu i jedna je od najčešćih matrica korištenih za IMAC zahvaljujući relativno jeftinoj cijeni i tome što može efikasno djelovati i nakon više krugova regeneracije. Način vezanja polihistidinskog privjeska (preko dušikovih atoma histidina) i Ni-NTA matrice prikazan je na slici 2. Nekoliko daljnjih prednosti

uspostavile su afinitetnu kromatografiju na imobiliziranim ionima metala kao najčešće korištenu metodu za pročišćavanje rekombinantnih proteina. His-tag je sam po sebi male veličine i time ne interferira i ne ometa funkciju svog proteinskog partnera. Također, pokazao je svojstvo inertnosti i niske imunogenosti. His-tag ima prednost kod pročišćavanja netopljivih proteina jer je IMAC pogodna za sve denaturirajuće reagense. Vezani proteini mogu se otpustiti s matrice dodatkom imidazola u pufer za ispiranje, promjenom pH ili dodatkom EDTA. Poput svake metode i ova ima nekoliko nedostataka od kojih je najistaknutiji taj da se metalni ioni mogu vezati i sa nativnim histidinskim dijelovima ili nekim drugim aminokiselinama (glutamat, aspartat, cistein) proteina čime se smanjuje selektivnost.⁸



Slika 2. Prikaz veze između polihistidinskog privjeska i Ni-NTA matrice.⁹

4.2. Strep - tag

Zajedno s histidinskim privjeskom Strep-tag je jedan od najčešće korištenih afinitetnih privjesaka za pročišćavanje rekombinantnih proteina. To je mali peptid vezan bilo na N- ili C-kraj proteina, inertan je i ne utječe na biološku funkciju svog proteina domaćina. Pročišćavanje ovog tipa temelji se na jakoj nekovalentnoj interakciji između biotina i streptavidina. Strep-tag pročišćavanje proteina veoma je korisno jer se može provesti za prirodne i aktivne proteine pri fiziološkim uvjetima. Detaljnim istraživanjima otkrivena je podvrsta Strep-tag II, peptid koji se sastoji od osam aminokiselina i veže se na Strep-tactin, derivat streptavidina prema kojemu ima puno veći afinitet nego običan Strep-tag prema

samom streptavidinu. Strep-tag se često koristi u kombinaciji s polihistidinskim privjeskom za uzastopnu afinitetnu kromatografiju (eng. *tandem affinity purification*; TAP) u slučajevima kad istraživanja iziskuju veoma čiste proteine.^{4,8}

Primjenu ove vrste privjeska pronalazimo kod enzima NADH ubikvitin oksidoreduktaze poznatijeg i kao kompleks I. To je enzim koji kao prvi prenositelj u nizu sudjeluje u procesu prijenosa elektrona respiratornim lancem čime se osigurava potrebna energija stanicama. Sastoji se od tri fragmenta a jedan od ta tri topljiva NADH dehidrogenaza, koja služi za ulazak elektrona, može se pročititi afinitetnom kromatografijom vezanjem Strep-tag II na N- ili C-kraj jedne od podjedinica (NuoE, F i G). Fragmenti koji su sadržavali afinitetni privjesak na C-kraju podjedinica NuoF i G pokazali su veliki afinitet prema Strep-tactinu i njihovim pročišćavanjem u samo jednom koraku dobiveno je oko 10-15 mg više od 95% čistog proteina.¹¹

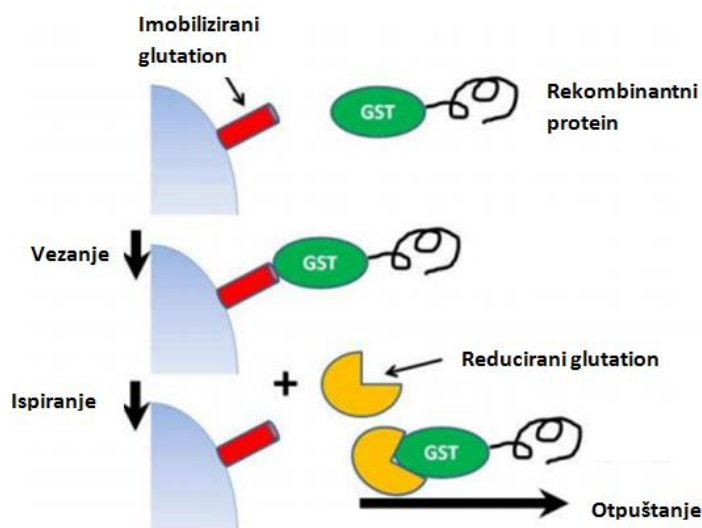
4.3. Vezni protein za maltozu (MBP)

MBP (eng. *maltose binding protein*) protein je nativni protein u *E. coli* zadužen za transport maltoze i maltodekstrina preko citoplazmatske membrane te se specifično veže na matricu od umrežene amilozne smole. Osim što djeluje kao afinitetni privjesak i omogućuje pročišćavanje rekombinantnih proteina u jednom koraku do razine čistoće od 70-90 %, ovaj protein može poboljšati topljivost i smatanje netopljivih proteina. Način na koji MBP utječe na poboljšanje topljivosti ili smatanje nije potpuno razjašnjen. Postoji pretpostavka da se u blizini proteina i njegovog MBP privjeska nalaze regrutirani MBP šaperoni koji imaju učinak na spomenuta svojstva. Ispiranje ciljanog proteina može se provesti pri blagim uvjetima s niskim koncentracijama maltoze. MBP-sistem također se koristi u kombinaciji s drugim afinitetnim privjescima, najčešće polihistidinskim, pri čemu se kromatografija provodi IMAC metodom.⁴

4.4. Glutation-S-transferaza (GST)

GST (eng. *glutathion-S-transferase*) je enzim iz skupine enzima koji kataliziraju reakciju između nukleofila, reduciranog glutathiona i elektrofila. Nadalje, kod eukariota ima funkciju obrane organizma od štetnih reaktivnih kisikovih oblika. U afinitetnoj kromatografiji jedan je od poznatijih privjesaka koji osim pročišćavanja rekombinantnih proteina pomaže u poboljšanju topljivosti i stabilnosti čime se povećava njegova upotreba. GST na ciljanom proteinu (N- ili C-kraj) veže se na imobilizirani oblik glutathiona koji djeluje kao ligand na

način kako je prikazano na slici 3. Vezani protein ispire se pri blagim nenedenaturirajućim uvjetima s reduciranim glutationom. Usprkos mnogim prednostima GST može zakomplicirati pročišćavanje jer zbog svoje veličine (homodimer molekulske mase 26 kDa) ima tendenciju stvaranja netopljivih agregata i može utjecati na funkciju proteina. Uz to, GST proteini imaju izložene cisteinske ostatke koji teže stvaranju disulfidnih mostova odnosno oksidativnoj agregaciji.^{4,8}



Slika 3. Postupak pročišćavanja GST obilježenog rekombinantnog proteina.⁹

4.5. Protein SUMO

Dodavanje SUMO proteina na ciljani rekombinantni protein u svrhu njegovog pročišćavanja jedna je od novije razvijenih metoda afinitetne kromatografije koja još treba biti istražena i opisana ali je već u samim počecima pokazala jedinstvena i korisna svojstva. SUMO je protein sačinjen od otprilike 100 aminokiselina. Esencijalan je za mnoge stanične funkcije poput prijenosa signala ili stabilizacije proteina. Otkriveno je da se na N-kraj ciljanog proteina veže kovalentnom vezom i kasnije se odcjepljuje pomoću specifičnih SUMO proteaza koje prepoznaju određene sljedove glicina u SUMO privjesku i ne oštećuju odnosno ne cijepaju ciljani protein. To čini SUMO protein dobrim afinitetnim privjeskom jer nativni N-kraj ciljanog proteina ostaje u potpunosti očuvan. Cijeli sistem koji uključuje SUMO protein također vodi poboljšanju ekspresije i topljivosti proteina.⁸

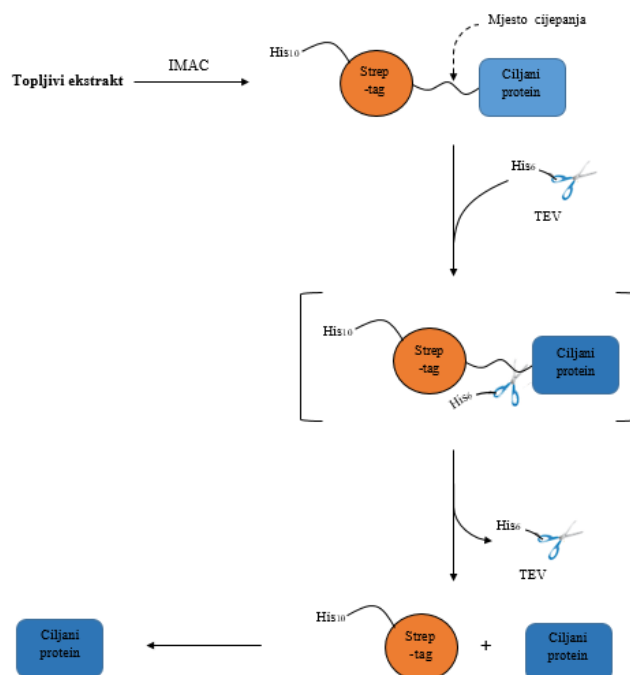
4.6. Uzastopna afinitetna kromatografija (TAP)

Prvi razvijeni oblik TAP-a (eng. *tandem affinity purification*) se sastojao od dvije vrste afinitetnih privjesaka – proteina A i proteina koji veže kalmodulin (eng. *calmodulin binding*

protein; CBP) međusobno razdvojenih kratkim peptidom koji predstavlja mjesto cijepanja proteaze iz TEV-a (eng. *tobacco etch virus*). Protein A čvrsto se veže na imunoglobulin G matriks nakon čega se vrši eluiranje u prisutnosti spomenute proteaze TEV-a. Time se postiže odvajanje proteina A nakon čega zaostaje CBP vezan na kalmodulinski matriks u prisutnosti Ca^{2+} . CBP se otpušta pri blagim uvjetima eluiranja s EGTA (eng. *ethylene glycol tetraacetic acid*).^{13,14}

TAP je dakle afinitetna metoda koja se temelji na spajanju dvaju afinitetnih privjesaka, odvojenih sekvencom koja predstavlja mjesto cijepanja proteaze, na ciljani protein. Prednost ove metode je što omogućava pročišćavanje rekombinantnih proteina s niskom pozadinom kontaminacije istih zahvaljujući dvostrukom koraku pročišćavanja. Problem nastaje zbog veličine privjesaka koji mogu poremetiti funkciju ciljanog proteina ili stvaranje kompleksa s drugim proteinima. Danas se koriste različite kombinacije pojedinih afinitetnih privjesaka kako bi se smanjili ovi nedostaci uključujući npr. polihistidinski privjesak ili poznati Strep-tag.^{10,16}

Upravo tu kombinaciju polihistidinskog privjeska i Strep-tag koristili su prilikom ekspresije i pročišćavanja ljudskog kanabinoidnog receptora CB₂, receptora iz skupine endokanabinoidnog sistema zaduženog za različite fiziološke procese poput apetita, raspoloženja, osjećaja boli i slično. Za učinkovito pročišćavanje upotrijebljen je afinitetni privjesak His₁₀ na C-kraju proteina te čak dva identična Strep privjeska na N-kraju proteina premoštena pomoću sekvence od 4 aminokiseline. Afinitetni privjesci uklonjeni su pomoću proteaze TEV-a. Pročišćavanje je provedeno u blagim uvjetima u prisustvu neionskog deterdženta DDM-a (eng. *dodecyl maltoside*), zwitterionskog deterdženta CHAPS te sredstava potrebnih za održavanje stabilnosti CB₂ (slika 4).¹⁰



Slika 4. Shematski prikaz pročišćavanja proteina iz *E. coli* koristeći dvojni His₁₀-Strep-tag afinitetni privjesak.

Tablica 1. Prednosti i nedostaci nekih od najčešće korištenih afinitetnih privjesaka.

Privjesak	Prednosti	Nedostaci
GST	Učinkovita inicijacija translacije Jeftina smola za afinitetnu matricu Blagi uvjeti ispiranja	Veliki metabolički teret Veliki homodimerni protein
MBP	Učinkovita inicijacija translacije Jeftina smola za afinitetnu matricu Poboljšava topljivost Blagi uvjeti ispiranja	Veliki metabolički teret
His ₆	Mali metabolički teret Jeftina smola za afinitetnu matricu Blagi uvjeti ispiranja Djeluje i u denaturirajućim uvjetima	Specifičnost IMAC metode nije visoka kao kod drugih metoda Ne poboljšava topljivost
Strep	Mali metabolički teret Visoka specifičnost	Skupa smola za afinitetnu matricu Ne poboljšava topljivost

§ 5. UKLANJANJE AFINITETNIH PRIVJESAKA

Afinitetni privjesci svojom su pojavom i razvojem uvelike olakšali i ubrzali mnoga istraživačka područja zahvaljujući sposobnosti specifičnog prepoznavanja i vezanja koje omogućuje razne načine pročišćavanja rekombinantnih proteina. U nekim slučajevima, afinitetni privjesci osim spomenutog, povećavaju topljivost i unaprjeđuju pravilno smatanje tih istih proteina na koje su vezani pomoću genetskih modifikacija. Međutim, afinitetni privjesci imaju i svoju lošu stranu a to je da unatoč mnogim prednostima svaki privjesak uvijek ima potencijal interferirati sa strukturom ili funkcijom svog partnera proteina. Zbog toga je veoma bitno da se svaki afinitetni privjesak nakon pročišćavanja može ukloniti s proteina na kojega je prethodno bio vezan. Ulogu cijepanja afinitetnih privjesaka preuzimaju i najbolje obavljaju proteolitički enzimi. Prilikom dodavanja afinitetnih privjesaka na ciljani protein dodaju se i mjesta prepoznavanja sa specifičnim sekvencama koja dopuštaju cijepanje privjesaka upotrebom spomenutih proteaza. Uz proteaze razvili su se i afinitetni privjesci za koje je karakteristično da se samostalno odcjepljuju s rekombinantnih proteina. Prednost takvih privjesaka je što je smanjen ukupan broj koraka potrebnih za dobivanje konačnog produkta pročišćavanja.

5.1. Endoproteaze

Posljednjih desetljeća otkriveno je da virusne proteaze pokazuju strožu specifičnost i time im se povećava upotreba naspram do tada korištenih serinskih proteaza. Najpoznatije serinske proteaze su faktor Xa, trombin i enteropeptidaze. Postoje mnogi primjeri da serinske proteaze ne cijepaju na mjestima prepoznavanja čime dolazi do narušavanja strukture proteina. U skupinu virusnih proteaza spadaju TEV proteaza i proteaza 3C rinovirusa. Zahvaljujući niskom obrtnom broju ova vrsta proteaza lakše pronalazi proteolitička mjesta cijepanja. Primjeri upotrebe nekih od spomenutih proteaza nalaze se na slici 5.⁵

5.1.1. Enteropeptidaze

Enteropeptidaze se mogu dobiti pročišćavanjem iz prirodnih izvora ili proizvesti ekspresijom u *E. coli* čime nastaju rekombinantne enteropeptidaze. Prirodno proizvedene postoje u obliku heterodimera i intenzivno su glikozilirane. Proizvodnja ovih proteaza tehnikama

rekombinantne DNA je prednost samim time što se tom prilikom enzimi mogu označiti afinitetnim privjescima kako bi se kasnije lakše uklonili od produkata cijepanja. Enteropeptidaze su sposobne cijepati afinitetne privjeske na N-kraju proteina i stvarati produkte s neoštećenim peptidnim lancima. Mjesto prepoznavanja ovih proteaza sastoji se od aminokiselinskog slijeda DDDDK↓.⁵

5.1.2. Trombin

Prirodni izvor trombina je goveđa plazma a procesi za dobivanje rekombinantnog trombina danas nisu poznati i to je glavni nedostatak ovih endoproteaza jer to znači da se ne mogu označiti afinitetnim privjescima. Trombin je po strukturi sličan enteropeptidazama te sadrži intramolekulske disulfidne veze zbog čega je osjetljiv na dodatke reducirajućih reagensa. Sekvenca koja predstavlja mjesto prepoznavanja sadrži aminokiseline LVPR↓GS.⁵

5.1.3. Faktor Xa

Faktor Xa potječe iz krvne plazme ili se može eksprimirati rekombinantno i izlučiti iz stanica sisavaca. Iako postoje načini za proizvodnju rekombinantnih vrsta ovih endoproteaza, ne postoje načini kojima bi se oni mogli obilježiti afinitetnim privjescima. Faktor Xa jedan je od osjetljivijih proteolitičkih enzima čiji inhibitori su svi reducirajući reagensi, kelirajući reagensi poput EDTA i razni deterdženti. Mjesto prepoznavanja za faktor Xa sastoji se od aminokiselina IEGR↓.⁵

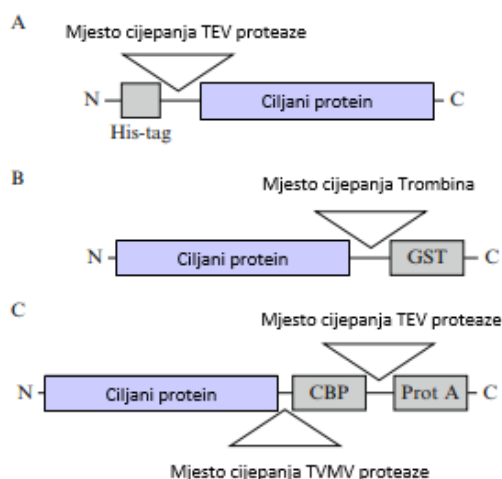
5.1.4. Proteaza TEV-a

U skupini virusnih proteaza najbolje je opisana i najviše korištena proteaza TEV-a dobivena iz posebne porodice virusa duhana. Najčešće mjesto prepoznavanja proteaze TEV-a sastoji se od sedam aminokiselina ENLYFQ↓G a proteolitička domena koja prepoznaje to mjesto nalazi se na C-kraju enzima. Proizvodnja proteaze TEV-a u stanicama *E. coli* povećana je uvođenjem raznolikih afinitetnih privjesaka (histidin, GST, MBP) koji olakšavaju uklanjanje proteolitičkog enzima nakon cijepanja. Proteaza TEV-a nije osjetljiva na reducirajuće reagense ali je osjetljiva na reagense koji alkiliraju tiole. Ova vrsta proteaza uživa veliku prednost ispred ostalih zahvaljujući širokom rasponu aminokiselina koje se mogu nalaziti na pozicijama P5 (N), P4 (L) i P2 (F) njezinih supstrata. Međutim ponekad se može dogoditi da ta varijabilnost određenih aminokiselina dovede do smanjenja učinkovitosti djelovanja proteaze. Sustavna istraživanja otkrila su da je pozicija P1' odnosno mjesto koje pripada prvoj

aminokiselini nakon mjesta cijepanja tolerantno širokom rasponu aminokiselina. Najveću toleranciju postigle su male aminokiseline poput glicina, alanina, serina i cisteina.⁵

5.1.5. Proteaza 3C iz humanog rinovirusa

Proteaza 3C iz rinovirusa svojstvima nalikuje proteazi TEV-a. Komercijalno je dostupna s GST afinitetnim privjeskom ili kombinacijom GST-His₆. Slijed koji predstavlja mjesto prepoznavanja za proteazu 3C iz rinovirusa je LEVLFQ↓GP. Glavni nedostatak proteaze 3C iz rinovirusa predstavlja dipeptid Gly-Pro koji zaostaje na N-kraju ciljanog proteina. Gotovo i ne postoji šansa za proizvodnjom rekombinantnog proteina s nativnim N-krajem kao kod proteaze TEV-a.⁵



Slika 5. Shematski prikaz pojedinačno označenih proteina i TAP metode. (A) Ciljani protein s His-tagom na N-kraju; (B) Ciljani protein s GST privjeskom na C-kraju; (C) Ciljani protein s TAP privjeskom na C-kraju¹²

5.2. Egzoproteaze

U skupinu egzoproteaza spadaju aminopeptidaze i karboksipeptidaze. Njihova upotreba nije raširena u tolikoj mjeri jer je većina afinitetnih privjesaka smještena na N-krajevima rekombinantnih proteina iako postoje slučajevi u kojima je to prvenstveno C-kraj i iz tog razloga postoje i egzoproteaze. Endoproteolitičkim cijepanjem afinitetnih privjesaka na C-krajevima rekombinantnih proteina nastajali bi neprirodni ostaci proteina.⁵

5.2.1. Metalokarboksiptidaze

Najpoznatija vrsta karboksiptidaza poznata je pod nazivom „probavne karboksiptidaze“. Dije se na dvije skupine s obzirom na vrstu aminokiselina koje se nalaze na C-kraju. Karboksiptidaze tipa A cijepaju C-krajeve koji sadrže aromatske ili razgranate alifatske bočne ogranke dok karboksiptidaze tipa B preferiraju C-krajeve s bazičnim aminokiselinama. Karboksiptidaze se javljaju u obliku inaktivnih zimogena s N- signalnim krajem kao oznakom za izlučivanje iz stanice, a dijelovi tih zimogena koji nisu katalitički aktivni se cijepaju također proteolitičkim enzimima kako bi karboksiptidaze prešle u svoj aktivni oblik. Probavne karboksiptidaze ovisne su o cinku i inhibira ih prisutnost kelirajućih reagensa poput EDTA. Zbog kompleksnog načina aktiviranja spomenutih metalokarboksiptidaza, unatoč razvijenim metodama ekspresije proteina, gotovo se sve komercijalno dostupne metalokarboksiptidaze i dalje dobivaju iz prirodnih izvora. Nedavna istraživanja dala su izrazito male prinose (0,25 mg) rekombinantno obilježenih karboksiptidaza A (histidinskim privjescima). Svinjska karboksiptidaza tipa B (250 mg/L), te karboksiptidaza tipa B štakora (40 mg/L) dobivene su ekspresijom u stanicama *E. Coli*. Nažalost, nijedan od dobivenih enzima nije proizveden tako da sadrži afinitetne privjeske u svrhu olakšanog izdvajanja iz stanice i od ostalih produkata, što umanjuje uspješnost ovih eksperimenata.⁵

5.2.2. Aminopeptidaze

Iako se endoproteaze najčešće upotrebljavaju za cijepanje afinitetnih privjesaka s N-krajeva polipeptida, aminopeptidaze su vrsta egzoproteaza koje se ponekad koriste u te svrhe. Najpoznatija aminopeptidaza DAP-aza (eng. *dipeptidyl-aminopeptidase I*) pripada skupini triju enzima koji djeluju kao cjelina. DAP-aza katalizira postepeno uklanjanje dipeptida s N-kraja proteina. Ne može ukloniti bilo koje afinitetne privjeske koji se tamo nalaze i najčešće se koristi prilikom cijepanja polihistidinskih privjesaka. Zbog postojanja disulfidnih veza između polipeptidnih lanaca DAP-aze ovaj enzim inhibiran je djelovanjem reducirajućih reagensa.⁵

§ 6. ZAKLJUČNE NAPOMENE

Afinitetna kromatografija je danas najčešće izabrana skupina tehnika prilikom pročišćavanja proteina. Karakteriziraju ju mnoge prednosti naspram ostalih tehnika iako ovisi o više faktora počevši od vrste i izbora afinitetnih privjesaka do izbora i dostupnosti liganada. Što se tiče liganada najbolji izbor su ligandi biološkog podrijetla zahvaljujući visokoj specifičnosti, međutim, oni nisu najjeftiniji i najdostupniji izbor. Svoju prednost u tom slučaju iskazuju strukturni ligandi koji uključuju između ostalog metal kelirajuće ligande komplementarne s His-tagom. Problem sa strukturnim ligandima je to što njima nedostaje određeni stupanj specifičnosti zbog čega se proces pročišćavanja produljuje za nekoliko koraka.

Afinitetni privjesci drugi su najveći izazov afinitetne kromatografije ali istovremeno otvaraju razne mogućnosti zahvaljujući svojoj raznolikosti. Postoji veliki repertoar afinitetnih privjesaka koji mogu djelovati kao što je već spomenuto, u svrhu poboljšanja ekspresije, topljivosti ili jednostavno za pročišćavanje i detekciju proteina. I dalje nije potpuno razjašnjeno na koji način afinitetni privjesak utječe na topljivost svog partnera proteina. Moguće je da se afinitetni privjesci ponašaju kao magneti za šaperone ili oni sami mogu djelovati kao molekula šaperona. Prilikom odabira afinitetnih privjesaka treba uzeti u obzir to da nijedan nije idealan i da se postupak pronalaženja idealnog privjeska ili kombinacije više njih sastoji od uzastopnih testiranja sve dok se ne pronađe neki s najvećim krajnjim prinosima.

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-affinity-purification.html> (preuzeto 26.7.2018.)
2. <https://www.creative-biostructure.com/custom-affinity-chromatography-service-257.htm> (preuzeto 12.8.2018.)
3. P.T. Wingfield, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **80** (2015) 6.1.1-6.1.35.
4. M. E. Kimple, A. L. Brill, R. L. Pasker, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **73** (2013) 9.9.1-9.9.23.
5. D. S. Waugh, *Protein Expr. Purif.* **80** (2011) 283-293.
6. D. S. Waugh, *Trends Biotechnol.* **Vol. 23** (2005) 316-320.
7. A. S. Pina, C. R. Lowe, A. A. Roque, *Biotechnol. Adv.* **32** (2013) 366-381.
8. D. Walls, S. T. Loughran, *Methods Mol. Biol.* **Vol. 681** (2011) 151-175.
9. S. Magdeldinand A. Moser *Affinity Chromatography: Principles and Applications*, InTeh Shangai (2012) 3-24.
10. S. C. Locatelli-Hoops, A. A. Yeliseev, *Methods Mol. Biol.* **1177** (2014) 107-120.
11. S. Bungert, B. Krafft, R. Schlesinger, T. Friedrich, *FEBS Lett.* **460** (1999) 207-211.
12. R. R. Burgess, M. P. Deutscher, *Methods in enzymology*, Elsevier, San Diego, 2009.
13. <http://www.tulane.edu/~biochem/lecture/723/fig/TAPtag.pdf> (preuzeto 3.9.2018.)
14. <https://bitesizebio.com/8208/an-introduction-to-tandem-affinity-purification/> (preuzeto 3.9.2018.)
15. J. M. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb
16. A. P. Brown, V. Affleck, T. Fawcett, A. R. Slabas, *Journal of Experimental Botany* **Vol. 57** (2006) 1563-1571.